PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/45732
G01N 33/52, 33/72, 33/68, 33/84	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Dezember 1997 (04.12.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02834

(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Mai 1997 (30.05.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 22 089.0 31. Mai 1996 (31.05.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: WEISHEIT, Ralph [DE/DE]; Adlerweg 2A, D-82362 Weilheim (DE). SCHELLONG, Lieselotte [DE/DE]; Herrestrasse 11, D-82327 Tutzing (DE).

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: PROCESS FOR THE ANALYSIS OF MEDICAL SAMPLES CONTAINING HAEMOGLOBIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE HÄMOGLOBIN ENTHALTENDER MEDIZINISCHER PROBEN

(57) Abstract

The invention relates to a process for determining an analyte in a sample containing free haemoglobin. Determination is performed by optical measurement and the value measured for the analyte concentration is corrected by calculation. Said process is particularly suitable for determination of the parameters of total protein, iron and albumin in a medical sample, e.g. in a serum or plasma sample. The measured value for the analyte concentration is corrected by the following steps: (a) measurement of the blank value of the sample to be analysed; (b) measurement of the blank value of a reference value free of haemoglobin; (c) measurement of the uncorrected value for the analyte concentration; and (d) correction of the value obtained in step (c) by correlation with the values obtained in steps (a) and (b) to obtain the corrected value for the analyte concentration.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe, wobei die Bestimmung durch eine optische Messung erfolgt und der für die Analytkonzentration gemessene Wert rechnerisch korrigiert wird. Insbesondere ist dieses Verfahren zur Bestimmung der Parameter Gesamtprotein, Eisen und Albumin in einer medizinischen Probe, z.B. in einer Serum- oder Plasmaprobe geeignet. Die Korrektur des Meßwerts für die Analytkonzentration erfolgt durch die Schritte (a) Messen des Leerwerts der zu analysierenden Probe, (b) Messen des Leerwerts einer Hämoglobin-freien Referenzprobe, (c) Messen des unkorrigierten Werts für die Analytkonzentration und (d) Korrigieren des in Schritt (c) erhaltenen Werts durch Korrelation mit den in Schritt (a) und (b) erhaltenen Werten, um den korrigierten Wert für die Analytkonzentration zu erhalten.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Analyse Hämoglobin enthaltender medizinischer Proben

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe, wobei die Bestimmung durch eine optische Messung erfolgt und der für die Analytkonzentration gemessene Wert rechnerisch korrigiert wird. Insbesondere ist dieses Verfahren zur Bestimmung der Parameter Gesamtprotein, Eisen und Albumin in einer medizinischen Probe, z. B. in einer Serum- oder Plasmaprobe geeignet.

Es ist allgemein bekannt, daß durch Hämolyse die Bestimmung einer Vielzahl von Analyten in teilweise erheblichem Maße gestört ist. Um dennoch unverfälschte Meßwerte zu erhalten, wurden in der Vergangenheit unterschiedliche Verfahren zu Hämolyse-Entstörung publiziert.

Wie im Patent EP-0 268 025 B1 erwähnt, wurde für einzelne Analyten ein graphischer Zusammenhang hergestellt zwischen Hämolysegrad und resultierendem Meßfehler. Daraus konnten Korrekturfaktoren abgeleitet werden, mit welchen dann auf Basis einer separaten Bestimmung des Hämolysegrades das erhaltene Analysenergebnis rechnerisch korrigiert wurde.

Jay und Provasek beschrieben ebenfalls, daß durch Bestimmung des Hämolysegrades und Verwendung eines Korrekturfaktors unverfälschte Werte in hämolytischen Proben erhalten werden können (Clin Chem 38/6, 1026 (1992) bzw. Clin Chem 39/9, 1804-1810 (1993)). Hier wird der Hämolysegrad durch eine separate Bestimmung des Hb-Gehalts in der Probe ermittelt.

In der Patentschrift US 4,263,512 wird empfohlen, neben dem Analyten den Grad Trübung (X), Hämolyse (Y) und Ikterus (Z) zu bestimmen und den gemessenen Analytwert (S) mit Hilfe der

Formel $S' = S - \alpha \cdot X - \beta \cdot Y - \gamma \cdot Z$ zu korrigieren. Dabei sind S' der korrigierte Analytwert und α, β und γ Korrekturfaktoren, die durch Messung des Einflusses von Trübung, Hämolyse und Ikterus mittels Referenzflüssigkeiten erhalten wurden. Die Ermittlung von X, Y und Z erfolgt durch Mehrkanalmessung und anschließender komplizierter Berechnung aus den erhaltenen Absorptionsdifferenzen unter Berücksichtigung des Anteils der jeweils anderen interferierenden Substanzen.

Ein Weg zur Korrektur von Hämolysestörungen ohne separate Bestimmung des Hämolysegrades wird durch DE 44 27 492 A1 aufgezeigt. Hier wurde ein mathematischer Zusammenhang gefunden zwischen dem Gehalt an durch Hämolyse aus den Erythrocyten freigesetzter Störsubstanz und einer vor der Hauptreaktion ablaufenden Vorreaktion. Mit Hilfe des somit während der Vorreaktion ermittelten Hämolysegrades kann das in der Hauptreaktion (Rate $_{total}$) erhaltene Analysenergebnis unter Ausnutzung des gefundenen Zusammenhangs zwischen Hämolysegrad und Störbeitrag entsprechend der Formel $Rate_{Substanz/Probe} = Rate_{total} - Rate_{Vorreaktion} - Rate_{Substanz/Erythrocyt}$ korrigiert werden,
wobei Substanz die zu bestimmende Komponente in der Probe bedeutet.

Häufig ist eine Störung durch Hämoglobin auch durch Messung des Probenleerwerts zu eliminieren. Dies gilt jedoch nicht für die Bestimmung von Totalprotein mittels Biuret-Methode (Morgan et al. Microchem J 44, 282-287 (1991)) und auch nicht für die Bestimmung von Albumin mittels Bromcresolgrün- bzw. -purpur-Methode. Für die Bestimmung von Eisen ist weiterhin bekannt, daß es stets dann zu Störungen durch Hämoglobin kommt, wenn Hb nicht vorher durch Dialyse aus der Probe entfernt wurde (Sonntag, J Clin Chem Clin Biochem 24/2, 127-139 (1986)). Auch bei Eisen ist die Hb-Störung nicht durch alleinige Messung des Probenleerwerts zu beseitigen.

Alle oben beschriebenen Entstörungsmethoden haben jedoch den Nachteil, daß sie mit erheblichem Arbeitsaufwand (Probenvor-

bereitung durch Dialyse bzw. separate Ermittlung des Hämolysegrades z. B. durch Bestimmung des Hb-Gehalts) und/oder komplizierten mathematischen Korrekturalgorithmen verbunden sind.

Außerdem sind die beschriebenen Verfahren alle bezogen auf Entstörung von durch Hämolyse verursachten Fehlmessungen. Mit der Entwicklung von Blutersatzmitteln auf Basis von Hämoglobin stellt sich die Frage nach der Beseitigung von Störungen durch natives oder synthetisches Hämoglobin bzw. Hb-analogen Verbindungen noch weit brisanter als bisher. Solche Störungen treten dann zum einen auch in nichthämolytischem Probenmaterial und zum anderen auch in weit höherem Grad auf als bei nativer Hämolyse, da bei Therapie mit Blutersatzmitteln der Hb-Gehalt im Blutserum oder -plasma mehr als 1000 mg/dl betragen kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, ein Verfahren zur Beseitigung von Störungen bereitzustellen, die durch natives Hämoglobin oder auf synthetischem Hb bzw. Hb-analogen Verbindungen basierenden Blutersatzmitteln hervorgerufen werden und nicht durch einfache Messung des Probenleerwerts zu beseitigen sind. Dieses Verfahren sollte außerdem gegenüber herkömmlichen Verfahren mit signifikant reduziertem Arbeitsaufwand verbunden sein und eine Entstörung bis mindestens 1000 mg/dl Hb garantieren.

Gelöst wurde die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe dadurch, daß überraschenderweise ein Zusammenhang gefunden wurde zwischen der Höhe des Probenleerwerts und dem Grad der Verfälschung der Meßergebnisse durch freies Hämoglobin. Dadurch ist es möglich, mit Hilfe einer einfachen mathematischen Korrekturformel auch bei großem Hb-Gehalt den korrekten Wert für die Analytkonzentration genau zu ermitteln. Im Vergleich zum Stand der Technik zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft dadurch aus, daß weder eine separate Ermittlung des Hb-Gehalts noch eine Bestimmung des Grades einer Vorreaktion erforderlich sind, um den Meßwert einer Hb-haltigen medizinischen Probe zu korrigieren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung, wobei man den gemessenen Wert für die Analytkonzentration korrigiert durch die Schritte:

(a) Messen des Leerwerts der zu analysierenden Probe,

(b) Messen des Leerwerts einer Hämoglobin freien Referenzprobe,

(c) Messen des unkorrigierten Werts für die Analytkonzentration und

(d) Korrigieren des in Schritt (c) erhaltenen Werts durch Korrelation mit den in Schritt (a) und (b) erhaltenen Werten, um den korrigierten Wert für die Analytkonzentration zu erhalten.

Der korrigierte Wert für die Analytkonzentration in Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise nach folgender Beziehung ermittelt:

$$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + F \cdot El_{Referenz}$$

wobei C'_{Probe} der korrigierte Wert für die Analytkonzentration ist,

C_{Probe} der unkorrigierte gemessene Wert für die Analytkonzentration in der Probe ist,

F ein testspezifischer Korrekturfaktor ist,

El_{Probe} der gemessene Leerwert in der Probe ist und

$El_{Referenz}$ der gemessene Leerwert in der Referenzprobe ist.

Die erfindungsgemäße Korrekturmethode ist für Verfahren geeignet, bei denen die Bestimmung des Analyten durch optische Messung erfolgt, insbesondere durch optische Messung bei Wellenlängen, bei denen eine Störung durch freies in der Probe vorliegendes Hämoglobin eintritt. Besonders bevorzugt erfolgt die optische Messung im Bereich von 500-750 nm.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Beispiele für solche Proben sind hämolytische Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die ein Blutersatzmittel enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden Erfindung unter den Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind derivatisierte, polymerisierte, modifizierte oder quervernetzte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, sowie rekombinant hergestelltes Hämoglobin.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Gesamtproteingehalt der Probe bestimmt. Diese Bestimmung erfolgt vorzugsweise nach der Biuret-Methode. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Eisengehalt der Probe bestimmt. Diese Bestimmung des Eisengehalts erfolgt vorzugsweise nach der Ferrozin-Methode. In noch einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Albumingehalt einer Probe bestimmt. Diese Bestimmung des Albumingehalts erfolgt vorzugsweise nach der Bromcresolgrün- oder Bromcresolpurpur-Methode. Bei der Bestimmung dieser Parameter, bei denen bisher keine einfache Entstörungsmethode für die Bestimmung Hämoglobin enthaltender Proben bekannt war, wird durch das erfindungsgemäße Verfahren überraschenderweise eine deutliche Vereinfachung der Meßprozedur erreicht.

Weiterhin zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren dadurch aus, daß selbst ikterische Proben mit einem hohen Bilirubingehalt bis mindestens 20 mg/dl problemlos vermessen werden kön-

nen. Eine Störung durch lipämische Proben kann durch Verwendung eines entsprechenden Aufhellmittels, welches z. B. dem Reagenz zugesetzt ist, eliminiert werden.

Als Probe wird beim erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise eine Serum- oder Plasmaprobe eingesetzt, insbesondere eine humane Serum- oder Plasmaprobe. Als Referenzproben werden günstigerweise Serum- oder Plasmaproben von klinisch gesunden Probanden verwenden. Besonders bevorzugt wird ein Hämoglobin-freier Serum- oder Plasmapool klinisch gesunder Probanden verwendet.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß es in einem Analyseautomaten durchgeführt werden kann, z. B. an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 704 oder 717 Analysegerät. Aufgrund der einfachen mathematischen Korrekturformel kann der Analyseautomat so programmiert werden, daß bereits der korrigierte Wert für die Analytkonzentration ausgegeben wird und eine nachträgliche rechnerische Korrektur nicht mehr erforderlich ist.

Ein wesentlicher Parameter für die Korrektur der gemessenen Analytkonzentration ist der testspezifische Korrekturfaktor F. Dieser Korrekturfaktor F wird vorzugsweise durch ein Verfahren ermittelt, welches die Schritte umfaßt:

(a) Bereitstellen einer Serie von mindestens 3 Proben mit gleichem Analytgehalt, wobei mindestens eine der Proben kein Hämoglobin enthält und mindestens 2 der Proben unterschiedliche Konzentrationen an freiem Hämoglobin enthalten,

(b) Messen des Leerwerts von jeder Probe, wobei der durch Anwesenheit von Hämoglobin verursachte Anstieg des Probenleerwerts gegenüber der Hämoglobin-freien Probe bestimmt wird,

(c) Messen der unkorrigierten Analytkonzentration in jeder Probe, wobei die durch Anwesenheit von Hämoglobin verursachte Meßwertverfälschung gegenüber der Hämoglobin-freien Referenzprobe bestimmt wird, und

(d) Korrelation der in Schritt (c) bestimmten Meßwertverfälschung mit dem in Schritt (b) bestimmten Anstieg des Probenleerwerts, um den testspezifischen Korrekturfaktor zu erhalten.

Günstigerweise wird bei der Bestimmung des Korrekturfaktors F eine Serie von Proben bereitgestellt, wobei mindestens 5 und beispielsweise 10 der Proben unterschiedliche Konzentrationen an freiem Hämoglobin enthalten. Die Konzentrationen an freiem Hämoglobin werden für die Probenserie beispielsweise im Bereich von 0 mg/dl bis mindestens 1000 mg/dl variiert.

Für eine bestimmte, freies Hämoglobin enthaltende Probe aus der Serie wird ein probenspezifischer Korrekturfaktor F' nach folgender Beziehung ermittelt:

$$F' = \Delta C : \Delta E1$$

wobei: Δ C der für jeweils eine Probe durch die Anwesenheit von freiem Hämoglobin verursachte Betrag der Meßwertverfälschung gegenüber der Referenzprobe ist ist und

Δ E1 der für jeweils eine Probe durch die Anwesenheit von freiem Hämoglobin verursachte Anstieg des Probenleerwerts gegenüber der Referenzprobe ist.

Aus den für die jeweiligen Proben bestimmten Korrekturfaktoren F' kann der testspezifische Korrekturfaktor F durch Bildung des Mittelwerts ermittelt werden. Auf diese Weise konnte beim Nachweis von Albumin durch die Bromcresolgrün-Methode ein Korrekturfaktor F von 0,332, beim Nachweis von Eisen durch die

Ferrozin-Methode ein Korrekturfaktor F von 0,290 und beim Nachweis von Gesamtprotein durch die Biuret-Methode ein Korrekturfaktor von 0,115 ermittelt werden. Bei Anwendung dieser Korrekturfaktoren wurde eine hervorragende Wiederfindungsrate des zu bestimmenden Analyten bei hämoglobinhaltigen Proben gefunden.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

Allgemeine Methoden

1. Ermittlung des Korrekturfaktors (siehe auch Beispiele 1-3):

Aus einem Serum- oder Plasmapool klinisch gesunder Probanden werden 11 Proben mit unterschiedlichen Mengen Hämolysat, Hämoglobin oder einer Hb-analogen Verbindungen derart aufgestockt, daß bei gleichbleibendem Analytgehalt eine Hb-Konzentrationsreihe entsteht, deren niedrigste Probe (= Referenz) kein Hb und deren höchste Probe mindestens 1000 mg/dl Hb enthält. Alle Proben dieser Reihe werden mit dem jeweiligen Test vermessen, wobei für jede Probe ein entsprechend ihres Hb-Gehalts gegenüber der Referenz verfälschter Analytwert erhalten wird.

Für jede Probe wird der durch Hb verursachte Anstieg des Probenleerwerts $\Delta E1$ gegenüber dem Probenleerwert der Hb-freien Probe (= Referenz) ermittelt: $\Delta E1 = E1_{Probe} - E1_{Referenz}$.
Weiterhin wird für jede Probe der durch Hb verursachte Betrag der Analytenwertverfälschung ΔC gegenüber dem in der Referenz gemessenen Analytwert ermittelt: $\Delta C = C_{Probe} - C_{Referenz}$.

Bei Division des Störanteils ΔC durch den Betrag des Probenleerwertanstiegs $\Delta E1$ erhält man für jede Probe einen Korrekturfaktor $F'_{Probe} = \Delta C : \Delta E1$.

Aus den somit erhaltenen 10 Einzelfaktoren der Hb-Konzentrationsreihe wird nun der gemittelte Korrekturfaktor F gebildet. Dieser Faktor ist eine feste Größe, der für Albumin, Eisen und

Total Protein einmalig ermittelt werden muß, für den jeweiligen Test dann jedoch konstant ist.

2. Berechnung des korrigierten Analytwerts (siehe auch Beispiele 4-8):

Durch rechnerische Korrektur des gemessenen Analytwerts der Probe C_{Probe} um den Störanteil ΔC wird der korrigierte und damit ungestörte Analytwert der jeweiligen Probe C'_{Probe} ermittelt:

$$C'_{Probe} = C_{Probe} - \Delta C$$
$$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot \Delta E$$
$$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot (El_{Probe} - El_{Referenz})$$
$$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + F \cdot El_{Referenz}.$$

Die Referenz ist, wie oben beschrieben, ein Hb-freier Serum- oder Plasmapool klinisch gesunder Probanden. Für die genannten Methoden ist der Einfluß der Schwankungsbreite von gemessenen Probenleerwerten verschiedener Patientenproben aufgrund des Verhältnisses von Probenleerwert zum Meßsignal vernachlässigbar gering. Selbst ikterische Proben mit einem Bilirubingehalt bis mindestens 20 mg/dl stören nicht. Eine Störung durch lipämische Proben kann durch Verwendung eines entsprechenden Aufhellmittels, welches z. B. dem Reagenz zugesetzt ist, eliminiert werden. Ikterische und lipämische Proben wurden hergestellt durch Aufstockung von Humanseren mit Bilirubin bzw. Intralipid® analog Glick (Clin Chem 32/3, 470-475 (1986)).

In einem automatisch messenden Analysegerät wie z. B. den Geräten Boehringer Mannheim/Hitachi 704 oder 717 kann die Berechnung des ungestörten Analytwerts so programmiert werden, daß bereits die korrigierten Werte ausgegeben werden und eine nachträgliche rechnerische Korrektur nicht mehr erforderlich ist. Diese Programmierung wird z. B. für Albumin am Boehringer Mannheim/Hitachi 704 Gerät wie folgt durchgeführt:

1. Parameter-Programm: Chemische Parameter:

	Test 1	Test 2
Test	(BLALB)	(ALB)
Assay Code	3-15-0	3-15-23
Probevolumen (µl)	4	4
R1-Volumen (µl)	350	350
R2-Volumen (µl)	0	350
Wellenlängen	700-600	700-600
Kalibration	K-Faktor	1-0-0
Std (1) Konz.-Pos (g/l)	0,00	0-1
Std (2) Konz.-Pos (g/l)		Sollwert-2

2. Monitor: Kalibrationsmonitor (1): Für Test 1 bei S1 Ext. 0 und bei K 100000 eingeben.

3. Der korrigierte Analytwert wird durch "Calculated Test" errechnet (siehe Boehringer Mannheim/Hitachi 704 Manual):

Calculated Test = (Test 2) - (Test 1)·F + $Konzentration_{Referenz}$

Test 2 ist die Bestimmung der Konzentration des gemessenen unkorrigierten Analytenwerts,

Test 1 ist die Bestimmung der Extinktion des Probenleerwerts,

F ist der für Albumin, Eisen bzw. Total Protein ermittelte Faktor zur Korrektur der Hb-Störung

$Konzentration_{Referenz}$ = F·$El_{Referenz}$ und wird als Konzentration eingegeben.

Beispiel 1

Ermittlung des Korrekturfaktors für die Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolgrün-Methode

Die Bestimmung wurde an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 704 Analysegerät mit dem Assay-Code 2-15-23 bei 37 °C durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 75 mmol/l Succinat-Puffer, pH 4,2.
Reagenz 2: 75 mmol/l Succinat-Puffer, pH 4,2; 0,3 mmol/l Bromcresolgrün.

Die Testdurchführung war wie folgt: zu 4 µl Probe wurden 350 µl Reagenz 1 und nach Bestimmung des Probenleerwerts 350 µl Reagenz 2 gegeben. Dann erfolgte nach einer Dauer von 2 min die Bestimmung des Analyten. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 600 nm und eine Nebenmeßwellenlänge von 700 nm verwendet.

Das Ergebnis dieser Bestimmung ist in Tabelle 1 gezeigt. Der Wert für den testspezifischen Korrekturfaktor wurde mit 0,332 ermittelt.

Beispiel 2

Ermittlung des Korrekturfaktors für die Bestimmung von Eisen durch die Ferrozin-Methode

Die Bestimmung wurde am Analysegerät Boehringer Mannheim/Hitachi 717 mit dem Assay-Code 2-24-30 bei 37 °C durchgeführt. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 150 mmol/l Na-Acetat-Puffer, pH 5,0; 4 mmol/l Guanidiniumchlorid; 100 mmol/l Thioharnstoff; Detergenz;

Reagenz 2: 150 mmol/l Ascorbinsäure, 50 mmol/l Ferrozin.

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 20 µl Probe wurden 250 µl Reagenz 1 und nach Bestimmung des Probenleerwerts 50 µl Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte dann nach einer Dauer von 1 min. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 546 nm und eine Nebenmeßwellenlänge von 700 nm verwendet.

Das Ergebnis des Versuchs ist in Tabelle 2 gezeigt. Es wurde für den testspezifischen Korrekturfaktor ein Wert von 0,290 ermittelt.

Beispiel 3

Ermittlung des Korrekturfaktors für die Bestimmung von Gesamtprotein nach der Biuret-Methode

Die Bestimmung erfolgte an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 717 Analysegerät mit dem Assay-Code 2-24-50 bei 37 °C. Es wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz 1: 200 mmol/l NaOH; 32 mmol/l K-Na-Tartrat;
Reagenz 2: 200 mmol/l NaOH; 32 mmol/l K-Na-Tartrat; 30,5 mmol/l KJ; 12,15 mmol/l Cu-Sulfat.

Die Testdurchführung war wie folgt: Zu 7 µl Probe wurden 250 µl Reagenz 1 und nach Bestimmung des Probenleerwerts 250 µl Reagenz 2 gegeben. Die Bestimmung des Analyten erfolgte dann nach einer Dauer von 5 min. Zur Messung wurden eine Hauptmeßwellenlänge von 546 nm und eine Nebenmeßwellenlänge von 700 nm verwendet.

Das Ergebnis des Versuchs ist in Tabelle 3 gezeigt. Der Wert für den testspezifischen Korrekturfaktor wurde mit 0,115 bestimmt.

Beispiel 4

Verwendung der Korrekturformel für die Albuminbestimmung

Der in Beispiel 1 ermittelte Korrekturfaktor wurde für die Bestimmung von hämoglobinhaltigen Proben verwendet, die durch Aufstockung mit Blutersatzmittel erhalten wurden.

Die Testdurchführung war wie in Beispiel 1 beschrieben.

Die Formel zur Berechnung der korrigierten Analytkonzentration in der Probe war wie folgt:

$$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + F \cdot El_{Referenz} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + 0{,}3\ g/l.$$

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 4 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß durch die Korrektur eine Wiederfindungsrate von 100 ± 1 % erreicht wurde.

Beispiel 5

Verwendung der Korrekturformel für die Bestimmung von Eisen

Unter Verwendung des in Beispiel 2 ermittelten Korrekturfaktors wurde eine Bestimmung von Eisen nach der Ferrozin-Methode in hämoglobinhaltigen Proben durchgeführt, die durch Aufstockung mit Hämolysat erhalten wurden.

Die Testdurchführung erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

Die Formel zur Berechnung des korrigierten Analysenwerts war wie folgt:

$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + F \cdot El_{Referenz} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} +$ 2,9 µg/dl.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 5 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß eine hervorragende Wiederfindung von Eisen erreicht wurde, die mit Ausnahme eines einzigen Werts im Bereich von 100 % ± 2,5 % lag.

Beispiel 6

Verwendung der Korrekturformel für die Bestimmung von Totalprotein

Es wurde unter Verwendung des in Beispiel 3 bestimmten Korrekturfaktors eine Bestimmung von Totalprotein nach der Biuret-Methode für Hämoglobin-haltige Proben durchgeführt, die durch Aufstockung mit Blutersatzmittel erhalten wurden. Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie in Beispiel 3 beschrieben.

Die Formel zur Berechnung des korrigierten Analytwerts war wie folgt:

$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + F \cdot El_{Referenz} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} +$ 0,6 g/l.

Das Ergebnis der Versuche ist in Tabelle 6 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Wiederfindung für Gesamtprotein in den allermeisten Fällen im Bereich von 100 ± 1 % lag.

Beispiel 7

Bestimmung von Albumin in ikterischen Proben

Es wurde der in Beispiel 1 ermittelte testspezifische Korrekturfaktor für die Bestimmung von Albumin nach der Bromcresolgrün-Methode bei ikterischen Proben verwendet, die Aufstockung mit Bilirubin erhalten wurden.

Die Testdurchführung erfolgte wie in Beispiel 1 beschrieben. Die Formel zur Berechnung des korrigierten Analytwerts war wie in Beispiel 4 beschrieben.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Tabelle 7 gezeigt. Es ist zu erkennen, daß die Anwendung der Korrekturformel zu keiner Verschlechterung bei der Wiederfindung führte.

Beispiel 8

Bestimmung von Eisen in lipämischen Proben

Es wurde der in Beispiel 2 ermittelte testspezifische Korrekturfaktor für die Bestimmung von Eisen nach der Ferrozin-Methode bei lipämischen Proben verwendet, die durch Aufstockung mit Intralipid® erhalten wurden.

Die Testdurchführung erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben. Die Formel zur Berechnung des korrigierten Analytwerts war wie in Beispiel 5 angegeben.

Das Ergebnis des Versuchs ist in Tabelle 8 dargestellt. Es ist zu erkennen, daß durch Anwendung der Korrekturformel keine verschlechterte Wiederfindung bei lipämischen Proben erreicht wurde.

Proben-Nr.	Hb-Gehalt [mg/dl]	E1 Probe [mE]	delta E1 [mE]	C Probe (= gemess.Werte) [g/l]	delta C [g/l]	F Probe [g/l]
1 (=Referenz)	0	1,0	-	32,4	-	-
2	200	6,8	5,8	34,3	1,9	0,328
3	400	12,5	11,5	36,1	3,7	0,322
4	600	18,1	17,1	38,0	5,6	0,328
5	800	23,5	22,5	40,0	7,6	0,338
6	1000	29,0	28,0	41,8	9,4	0,336
7	1200	34,5	33,5	43,8	11,4	0,340
8	1400	39,7	38,7	45,4	13,0	0,336
9	1600	44,9	43,9	47,0	14,6	0,333
10	1800	50,4	49,4	48,7	16,3	0,330
11	2000	56,6	55,6	50,9	18,5	0,333
						F = 0,332

Tab. 1

Tab. 2

Proben-Nr.	Hb-Gehalt [mg/dl]	E1 Probe [mE]	delta E1 [mE]	C Probe (= gemess.Werte) [µg/dl]	delta C [µg/dl]	F Probe [µg/dl]
1 (=Referenz)	0	10,1	-	80,0	-	-
2	100	46,8	36,7	89,3	9,3	0,253
3	200	75,6	65,5	99,3	19,3	0,295
4	300	114,0	103,9	110,3	30,3	0,292
5	400	146,2	136,1	120,3	40,3	0,296
6	500	180,8	170,7	129,0	49,0	0,287
7	600	214,0	203,9	140,0	60,0	0,294
8	700	245,4	235,3	150,3	70,3	0,299
9	800	280,9	270,8	157,3	77,3	0,286
10	900	314,4	304,3	166,7	86,7	0,285
11	1000	340,0	329,9	183,0	103,0	0,312
						F = 0,290

Proben-Nr.	Hb-Gehalt [mg/dl]	E1 Probe	delta E1	C Probe (= gemess.Werte) [g/l]	delta C [g/l]	F Probe [g/l]
1 (=Referenz)	0	5,1	-	55,2	-	-
2	200	21,7	16,6	57,0	1,8	0,108
3	400	37,8	32,7	58,6	3,4	0,104
4	600	53,9	48,8	61,1	5,9	0,121
5	800	70,9	65,8	63,4	8,2	0,125
6	1000	86,4	81,3	64,9	9,7	0,119
7	1200	103,4	98,3	66,9	11,7	0,119
8	1400	120,1	115,0	68,5	13,3	0,116
9	1600	135,7	130,6	70,1	14,9	0,114
10	1800	152,9	147,8	72,4	17,2	0,116
11	2000	167,8	162,7	73,5	18,3	0,112
						F = 0,115

Tab. 3

Proben-Nr.	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gemessene Albumin-Werte		E1 Probe [mE]	F x E1 Probe [g/l]	Korrigierte Albumin-Werte	
		C Probe [g/l]	Wiederfindung [%]			C' Probe [g/l]	Wiederfindung [%]
					F=0,322 g/l		
1 (=Referenz)	0	32,4	-	1,0	0,3 *	32,4	-
2	200	34,3	105,9	6,8	2,3	32,3	99,7
3	400	36,1	111,4	12,5	4,2	32,2	99,4
4	600	38,0	117,3	18,1	6,0	32,3	99,7
5	800	40,0	123,5	23,5	7,8	32,5	100,3
6	1000	41,8	129,0	29,0	9,6	32,5	100,3
7	1200	43,8	135,2	34,5	11,5	32,6	100,6
8	1400	45,4	140,1	39,7	13,2	32,5	100,3
9	1600	47,0	145,1	44,9	14,9	32,4	100,0
10	1800	48,7	150,3	50,4	16,7	32,3	99,7
11	2000	50,9	157,1	56,6	18,8	32,4	100,0
					* F x E1 Referenz		

Tab. 4

Tab. 5

Proben-Nr.	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gemessene Eisen-Werte		E1 Probe [mE]	F x E1 Probe [µg/dl]	Korrigierte Eisen-Werte	
		C Probe [µg/dl]	Wiederfindung [%]			C' Probe [µg/dl]	Wiederfindung [%]
					F=0,290 µg/dl		
1 (=Referenz)	0	80,0	-	10,1	2,9 *	80,0	-
2	100	89,3	111,6	46,8	13,6	78,6	98,2
3	200	99,3	124,1	75,6	21,9	80,3	100,4
4	300	110,3	137,9	114,0	33,1	80,1	100,1
5	400	120,3	150,4	146,2	42,4	80,8	101,0
6	500	129,0	161,2	180,8	52,4	79,5	99,4
7	600	140,0	175,0	214,0	62,1	80,8	101,0
8	700	150,3	187,9	245,4	71,2	82,0	102,5
9	800	157,3	196,6	280,9	81,5	78,7	98,4
10	900	166,7	208,4	314,4	91,2	78,4	98,0
11	1000	183,0	228,8	340,0	98,6	87,3	109,1
					* F x E1 Referenz		

Tab. 6

Proben-Nr.	Hb-Gehalt [mg/dl]	Gemessene TProtein-Werte		E1 Probe [mE]	F x E1 Probe [g/l]	Korrigierte TProtein-Werte	
		C Probe [g/l]	Wiederfindung [%]			C' Probe [g/l]	Wiederfindung [%]
					F=0,115 g/l		
1 (=Referenz)	0	55,2	-	5,1	0,6 *	55,2	-
2	200	57,0	103,3	21,7	2,5	55,1	99,8
3	400	58,6	106,2	37,8	4,3	54,9	99,5
4	600	61,1	110,7	53,9	6,2	55,5	100,5
5	800	63,4	114,9	70,9	8,2	55,8	101,1
6	1000	64,9	117,6	86,4	9,9	55,6	100,7
7	1200	66,9	121,2	103,4	11,9	55,6	100,7
8	1400	68,5	124,1	120,1	13,8	55,3	100,2
9	1600	70,1	127,0	135,7	15,6	55,1	99,8
10	1800	72,4	131,2	152,9	17,6	55,4	100,4
11	2000	73,5	133,2	167,8	19,3	54,8	99,3
					* F x E1 Referenz		

Proben-Nr.	Bilirubin-Gehalt [mg/dl]	Gemessene Albumin-Werte		E1 Probe [mE]	F x E1 Probe [g/l]	Korrigierte Albumin-Werte	
		C Probe [g/l]	Wiederfindung [%]			C' Probe [g/l]	Wiederfindung [%]
					F=0,332 g/l		
1 (=Referenz)	0	48,3	-	0,8	0,3	48,3	-
2	6	47,9	99,2	0,8	0,3	47,9	99,2
3	13	48,0	99,4	0,9	0,3	48,0	99,4
4	20	47,9	99,2	0,8	0,3	47,9	99,2
5	26	48,2	99,8	0,9	0,3	48,2	99,8
6	33	48,2	99,8	1,4	0,5	48,0	99,4
7	40	48,1	99,6	1,8	0,6	47,8	99,0
8	46	48,5	100,4	1,8	0,6	48,2	99,8
9	53	48,8	101,0	2,0	0,7	48,4	100,2
10	60	47,8	99,0	2,0	0,7	47,4	98,1
11	66	48,3	100,0	2,0	0,7	47,9	99,2

Tab. 7

Tab. 8

Proben-Nr.	Intralipid-Gehalt [mg/dl]	Gemessene Eisen-Werte		E1 Probe [mE]	F x E1 Probe [µg/dl]	Korrigierte Eisen-Werte	
		C Probe [µg/dl]	Wiederfindung [%]			C' Probe [µg/dl]	Wiederfindung [%]
					F=0,290 µg/dl		
1 (=Referenz)	0	82,7	-	13,2	3,8	81,8	-
2	100	83,7	101,2	13,1	3,8	82,8	101,2
3	200	84,7	102,4	13,0	3,8	83,8	102,4
4	300	84,3	101,9	13,2	3,8	83,4	102,0
5	400	86,0	104,0	13,3	3,9	85,0	103,9
6	500	81,3	98,3	13,4	3,9	80,3	98,2
7	600	84,3	101,9	13,6	3,9	83,3	101,8
8	700	80,7	97,6	13,3	3,9	79,7	97,4
9	800	86,7	104,8	13,4	3,9	85,7	104,8
10	900	85,3	103,1	13,4	3,9	84,3	103,1
11	1000	82,7	100,0	13,6	3,9	81,7	99,9

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung, wobei man den gemessenen Wert für die Analytkonzentration korrigiert durch die Schritte:

 (a) Messen des Leerwerts der zu analysierenden Probe,

 (b) Messen des Leerwerts einer Hämoglobin freien Referenzprobe,

 (c) Messen des unkorrigierten Werts für die Analytkonzentration und

 (d) Korrigieren des in Schritt (c) erhaltenen Werts durch Korrelation mit den in Schritt (a) und (b) erhaltenen Werten, um den korrigierten Wert für die Analytkonzentration zu erhalten.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß der korrigierte Wert für die Analytkonzentration nach folgender Beziehung ermittelt wird:

$$C'_{Probe} = C_{Probe} - F \cdot El_{Probe} + F \cdot El_{Referenz}$$

 wobei C'_{Probe} der korrigierte Wert für die Analytkonzentration ist,

 C_{Probe} der unkorrigierte gemessene Wert für die Analytkonzentration in der Probe ist,

 F ein testspezifischer Korrekturfaktor ist,

 El_{Probe} der gemessene Leerwert in der Probe ist und

$El_{Referenz}$ der gemessene Leerwert in der Referenzprobe ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des Analyten durch eine optische Messung im Bereich von 600-700 nm erfolgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Probe bestimmt, die ein Blutersatzmittel enthält.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Gesamtproteingehalt der Probe bestimmt.

6. Verfahren nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach der Biuret-Methode erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Eisengehalt der Probe bestimmt.

8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des Eisengehalts nach der Ferrozin-Methode erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Albumingehalt der Probe bestimmt.

10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des Albumingehalts nach der Bromcresolgrün- oder Bromcresolpurpur-Methode erfolgt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man bei der Bestimmung von lipämischen Proben ein Aufhellungsmittel zusetzt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-11,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung an einer Serum- oder Plasmaprobe durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Referenzprobe Serum- oder Plasmaproben von klinisch gesunden Probanden verwendet.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Verfahren in einem Analyseautomaten durchführt.

15. Verfahren nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Analyseautomat so programmiert wird, daß bereits der korrigierte Wert für die Analytkonzentration ausgegeben wird.

16. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung des testspezifischen Korrekturfaktors F die Schritte umfaßt:

(a) Bereitstellen einer Serie von mindestens 3 Proben mit gleichem Analytgehalt, wobei mindestens eine der Proben kein Hämoglobin enthält und mindestens 2 der Proben unterschiedliche Konzentrationen an freiem Hämoglobin enthalten,

(b) Messen des Leerwerts von jeder Probe, wobei der durch Anwesenheit von Hämoglobin verursachte Anstieg des Probenleerwerts gegenüber der Hämoglobin-freien Probe bestimmt wird,

(c) Messen der unkorrigierten Analytkonzentration in jeder Probe, wobei die durch Anwesenheit von Hämoglobin verursachte Meßwertverfälschung gegenüber der Hämoglobin-freien Referenzprobe bestimmt wird, und

(d) Korrelation der in Schritt (c) bestimmten Meßwertverfälschung mit dem in Schritt (b) bestimmten Anstieg des Probenleerwerts, um den testspezifischen Korrekturfaktor zu erhalten.

17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Serie von Proben bereitstellt, wobei mindestens 5 der Proben unterschiedliche Konzentrationen an freien Hämoglobinen enthalten.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Serie von Proben bereitstellt, deren Konzentration von 0 mg/dl bis mindestens 1000 mg/dl freies Hämoglobin variiert.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 16-18,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein probenspezifischer Korrekturfaktor F' für eine freies Hämoglobin enthaltende Probe nach folgender Beziehung ermittelt wird:

$$F' = \Delta C : \Delta E1$$

wobei: Δ C der für jeweils eine Probe durch die Anwesenheit von freiem Hämoglobin verursachte Betrag der Meßwertverfälschung gegenüber der Referenzprobe ist und

Δ E1 der für jeweils eine Probe durch die Anwesenheit von freiem Hämoglobin verursachte Anstieg des Probenleerwerts gegenüber der Referenzprobe ist,

und daß der testspezifische Korrekturfaktor F durch Bildung des Mittelwerts aus den für die jeweiligen Einzelproben bestimmten Korrekturfaktoren F' ermittelt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna nal Application No
PCT/EP 97/02834

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/52 G01N33/72 G01N33/68 G01N33/84

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	O. SONNTAG: "Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry" JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 24, no. 2, 1986, NEW YORK NY USA, pages 127-139, XP002042642 cited in the application see the whole document ---	1-19
A	DE 44 27 492 A (BOEHRINGER MANNHEIM) 8 February 1996 cited in the application see the whole document --- -/--	1-19

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 October 1997	17. 10. 97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Van Bohemen, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr ·nal Application No
PCT/EP 97/02834

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: new applications of an old technique." CLINICAL CHEMISTRY, vol. 25, no. 6, 1979, WINSTON-SALEM SC USA, pages 951-959, XP002037050 cited in the application see the whole document	1-19

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int 'ional Application No
PCT/EP 97/02834

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 4427492 A	08-02-96	EP 0695805 A	07-02-96
		JP 8101191 A	16-04-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02834

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/52 G01N33/72 G01N33/68 G01N33/84

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	O. SONNTAG: "Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry" JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 24, Nr. 2, 1986, NEW YORK NY USA, Seiten 127-139, XP002042642 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-19
A	DE 44 27 492 A (BOEHRINGER MANNHEIM) 8.Februar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-19

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
6.Oktober 1997	17. 10. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Van Bohemen, C

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte tionales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02834

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	B. HAHN ET AL.: "Polychromatic analysis: new applications of an old technique." CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 25, Nr. 6, 1979, WINSTON-SALEM SC USA, Seiten 951-959, XP002037050 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-19

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlic. ,en, die zur selben Patentfamilie gehören

Int 'ionales Aktenzeichen
PCT/EP 97/02834

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 4427492 A	08-02-96	EP 0695805 A	07-02-96
		JP 8101191 A	16-04-96